

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

18 FEB 2005

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. März 2004 (18.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/022765 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12P (74) Anwalt: KINZEBACH, Werner; Reistötter, Kinzebach & Partner (GbR), Sternwartstr. 4, 81679 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009218 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum: 20. August 2003 (20.08.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 38 980.2 20. August 2002 (20.08.2002) DE
102 53 112.9 13. November 2002 (13.11.2002) DE
102 58 971.2 16. Dezember 2002 (16.12.2002) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): SUNGENE GMBH & CO. KGAA [DE/DE]; Corrensstrasse 3, 06466 Gatersleben (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): FLACHMANN, Ralf [DE/DE]; Halberstädter Str. 20a, 06484 Quedlinburg (DE). SCHOPFER, Christel [DE/DE]; Konvent 38, 06484 Quedlinburg (DE). SAUER, Matt [DE/DE]; Markt 9, 06484 Quedlinburg (DE). KLEBSATTEL, Martin [DE/DE]; Weingarten 9, 06484 Quedlinburg (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 2004/022765 A2

(54) Title: METHOD FOR HYDROLYSING CAROTENOIDS ESTERS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HYDROLYSE VON CAROTINOIDESTERN

(57) Abstract: The invention relates to a method for hydrolysing enzymatic carotenoids esters and the use of said carotenoids and the products thereof as human and animal food.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Hydrolyse von Carotinestern, sowie die Verwendung der auf diese Weise hergestellten Carotinoide als Nahrungs- und Futtermittel.

Verfahren zur Hydrolyse von Carotinoidestern

Beschreibung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Hydrolyse von Carotinoidestern, sowie die Verwendung der auf diese Weise hergestellten Carotinoide als Nahrungs- und Futtermittel.

Carotinoide werden de novo in Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert.

- 10 Ketocarotinoide, also Carotinoide, die mindestens eine Keto-Gruppe enthalten, wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin, sind natürliche Antioxidantien und Pigmente, die von einigen Algen und Mikroorganismen als Sekundärmetabolite produziert werden.

- 15 So wird beispielsweise Astaxanthin von Bakterien und Hefe synthetisiert. Diese akkumulieren freies, nicht verestertes Astaxanthin. Mikroalgen marinen Ursprungs synthetisieren Astaxanthin und akkumulieren dieses in der Regel als Astaxanthinester; geringe Mengen an freiem Astaxanthin sind jedoch auch nachweisbar. Das bekannteste Beispiel ist *Haematococcus pluvialis*, eine Alge, die unter Licht- und Mineralienstress innerhalb von wenigen Tagen bis zu 5% des Trockengewichtes als Astaxanthinester (70-80% als Monoester) akkumuliert. Diese Algenanzucht unter Stressbedingungen wird großtechnisch und wirtschaftlich genutzt.

- 25 Astaxanthinester, hauptsächlich Diester, werden im Pflanzenreich natürlicherweise nur von einer Pflanze, dem Adonisröschen, produziert. Die Astaxanthinester werden in den Blütenblättern angereichert; freies Astaxanthin ist lediglich in äußerst geringen Spuren nachweisbar.

- 30 In genetisch verändertem Tabak (Mann, Harker, Pecker und Hirschberg; Nature Biotechnology 18(8), 888-892, 2000) wurde in den Nektarien der Blüte Astaxanthin synthetisiert. Die überwiegende Menge an Astaxanthin wird als Ester gespeichert.

- 35 Aufgrund ihrer farbgebenden Eigenschaften werden die Ketocarotinoide und insbesondere Astaxanthin als Pigmentierhilfsstoffe in der Tierernährung, vor allem in der Forellen-, Lachs- und Shrimpszucht verwendet.

- Zur Freisetzung der Carotinoide aus ihren Estern werden diese in herkömmlicher Weise in ein organisches Lösungsmittel überführt und anschließend alkalisch verseift. Dabei sind aber insbesondere Ketocarotinoide, wie Astaxanthin, Hydroxyechinenone,
- 40

Adonirubin und Adonixanthin, sehr oxidationsempfindlich, wodurch die Ausbeute an Wertprodukt stark vermindert wird.

5 Aus dem Stand der Technik ist auch die enzymatische Esterspaltung, insbesondere von Carotinoidestern, unter Verwendung von Lipasen oder Esterasen bekannt.

So beschreibt z.B. Liu et al in Nutritional Biochemistry 9, 178-183 (1998) die Lipase-katalysierte Hydrolyse von Xanthophyllen in Gegenwart von Gallensäure. Es wurden aber keine Ketocarotinoide analysiert.

10

Breithaupt beschreibt in Z. Naturforsch., 55c, 971-975 (2000) die enzymatische Hydrolyse von Carotinoidestern aus Roter Paprika mit Lipase aus *Candida rugosa*. Experimentelle Untersuchungen mit oben beschriebenen Ketocarotinoidestern werden nicht beschrieben. Für die untersuchten Carotinoidester werden Hydrolyseraten von 21 bis 15 59 % beschrieben.

Zorn et al. beschreiben in Enzyme and Microbial Technology, 32, 623 – 628 (2003) die Hydrolyse von Carotinoidestern aus *Tagetes erecta* und *Capsicum annuum*. Hydrolyseraten von 18 bis 44 % werden für *Tagetes erecta* und 30 bis 69% für *Capsicum annuum* beschrieben. Die Hydrolyse von oben beschriebenen Ketocarotinoidestern wurde nicht untersucht.

Aakermann et al. beschreiben in Biocatalysis and Biotransformation, 13, 157-163 (1996) die praktisch gescheiterten Versuche zur Hydrolyse von synthetischem Astaxanthin-Dipalmitat mit Lipase aus *Candida rugosa*. Es wurden lediglich 5% freies Astaxanthin und 6% Monopalmitat nachgewiesen. Auch mit Astaxanthin-Diacetat wurden keine signifikant besseren Ergebnisse erzielt.

30 Esterase-katalysierte Spaltungen von Carotinoidestern werden von Jacobs et al. in Comp. Biochem. Physiol. 72B, 157-162 (1982) beschrieben. Astaxanthin-Diester aus *Procambarus acutus* (Flußkrebs) werden zu 31% in den Monoester und zu 13% in freies Astaxanthin überführt. Eine Hydrolyse von bis zu 85% wird durch Erhöhung der Cholesterin-Esterase Konzentration für möglich gehalten, wobei aber jeglicher experimentelle Beleg für diese Behauptung fehlt. Die Autoren führen außerdem aus, dass die 35 Hydrolyse von der Art der Fettsäuren im Ester beeinflusst werden kann, ohne jedoch nähere Angaben zu machen.

Die enzymatischen Methoden zur Carotinoidesterhydrolyse gemäß Stand der Technik führen somit insgesamt zu keinen völlig zufriedenstellenden Ergebnissen, da die tatsächlich erzielten Hydrolyseraten sehr gering sind. Enzymatische Ketocarotinoidester-

Hydrolysen gemäß Stand der Technik verlaufen, soweit untersucht, ebenfalls noch nicht zufriedenstellend. Verlässliche Aussagen über den möglichen Verlauf der Hydrolyse-Reaktion bei Verwendung anderer Carotinoidester-Quellen, wie insbesondere Algen und Pflanzen, sind daher für den Fachmann nicht möglich.

5

Kurze Beschreibung der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher die Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens zur enzymatischen Hydrolyse von Carotinoidestern und insbesondere Ketocarotinoidestern.

10

Obige Aufgabe wurde gelöst durch Bereitstellung eines Verfahrens zur enzymatischen Hydrolyse von Carotinoidestern, wobei man einen Carotinoidester-haltigen Reaktanten, abgeleitet von einem natürlichen oder genetisch verändertem Organismus, mit einem esterspaltenden Enzym, ausgewählt unter Carboxylsäureester-spaltenden Hydrolasen (E.C. 3.1.1.), bis zur im wesentlichen quantitativen hydrolytischen Esterspaltung inkubiert und das (die) gebildete(n) Carotinoid(e) gegebenenfalls aus dem Reaktionsansatz isoliert.

15

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

20

a) allgemeine Definitionen:

In Rahmen der vorliegenden Erfindung sind „Carotinoide“ ausgewählt unter veresterbaren Carotinoiden, wie Zeaxanthin, alpha-Cryptoxanthin, beta-Cryptoxanthin, Capsorubin, Capsanthin, Violaxanthin, Neoxanthin, Lutein, Astaxanthin, Adonixanthin, Adonirubin, 3'-Hydroxyechinenon, 3-Hydroxyechinenon, ohne darauf beschränkt zu sein.

25

Eine bevorzugte Gruppe von Carotinoiden sind Ketocarotinoide.

30

In Rahmen der vorliegenden Erfindung sind „Ketocarotinoide“ ausgewählt unter veresterbaren, ketogruppenhaltigen Verbindungen, wie Astaxanthin, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin sowie Gemischen dieser Verbindungen.

35

Der „Ester“ eines Carotinoids/Ketocarotinoids kann sowohl ein Mono- als auch Polyester, insbesondere Diester oder ein Gemisch von verschiedenen Estern sein. Di- oder Polyester können von gleichen oder verschiedenen Carbonsäuren abgeleitet sein.

Ester sind insbesondere Ester von Fettsäuren. Geeignete Fettsäureester sind aufgebaut aus geradkettigen oder verzweigten, ein- oder mehrfach ungesättigten, gegebenenfalls substituierten C₆-C₃₀-Monocarbonsäuren. Beispiele für gesättigte unverzweigte Fettsäuren sind Capronsäure, Önanthsäure, Caprylsäure, Pelargonsäure, Caprinsäure, 5 Undecansäure, Laurinsäure, Tridecansäure, Myristinsäure, Pentadecansäure, Palmitinsäure, Margarinsäure, Stearinsäure, Nonadecansäure, Arachinsäure, Behensäure, Lignocerinsäure, Cerotinsäure und Melissinsäure. Beispiele für einfach ungesättigte Fettsäuren sind Palmitoleinsäure, Ölsäure und Erucasäure. Beispiele für zweifach ungesättigte Fettsäuren sind Sorbinsäure und Linolsäure. Beispiele für dreifach ungesättigte 10 Fettsäure sind Linolensäure und Elaeostearinsäure. Beispiele für vier- und mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind Arachidonsäure, Clupanodonsäure und Docosahexaensäure. Bevorzugt sind unverzweigte, gesättigte Fettsäuren. Weiterhin bevorzugt sind einwertige, gesättigte oder ein-, zwei- oder dreifach ungesättigte C₁₀₋₂₄, vorzugsweise C₁₂₋₂₀- oder C₁₄₋₂₀-Fettsäuren.

15 Carotinoide bzw. Ester gemäß obiger Definition umfassen diese Verbindungen sowohl in isomerenreiner Form als auch in Form von Stereisomerengemischen.

20 „Gesamtcarotinoide“ steht für die Summe aller Carotinoide und Carotinoidester gemäß obiger Definition.

Eine „im wesentlichen quantitative hydrolytische Esterspaltung“ bedeutet, dass erfindungsgemäß durch enzymatische Aktivität wenigstens einer der vorliegenden Carotinoidester, insbesondere wenigstens einer der vorliegenden Ketocarotinoidester, zu 25 wenigstens etwa 85 %, insbesondere wenigstens etwa 88 % hydrolysiert ist, so dass keine Estergruppen mehr im Molekül enthalten sind. Besonders bevorzugt erhält man erfindungsgemäß Hydrolyseraten von 100% oder weniger, wie z.B. 88 bis 99% oder 95 bis 99%.

30 Die „Hydrolyserate“ ist erfindungsgemäß definiert durch den prozentualen Anteil, um den die Menge an (z.B. extrahierten) Carotinoidestern in einem Reaktanden enzymkatalysiert abnimmt. Insbesondere lässt sich die Hydrolyserate dadurch bestimmen, dass man den Carotinoidester-Gehalt im Reaktanden vor und nach der erfindungsgemäßen enzymatischen Behandlung, z.B. chromatographisch wie in den Beispielen beschrieben, 35 bestimmt und daraus den Anteil hydrolysierter Ester bestimmt.

Der im Verfahren eingesetzte esterhaltige „Reaktand“ kann von natürlichen oder genetisch veränderten, rekombinanten Organismen abgeleitet sein. Der Reaktand kann dabei aus dem gesamten Organismus oder einem Teil (z.B. Blütenblättern) oder einer

Fraktion (z.B. erhalten nach Homogenisierung oder Zellaufschluss und anschließende Fraktionierung) davon stammen.

Der „Carotinoidgehalt“ eines Reaktanden ist definiert als die Menge an Gesamtcarotinoiden, bestimmt durch photometrische Messung nach der Methode von Lichtenthaler (Methods Enzymology 148, 350-382, 1987).

Der „Carotinoidestergehalt“ ist definiert als die Menge an Carotinoiden, die mit einer gesättigten oder ein-, zwei- oder dreifach ungesättigten C₁₀₋₂₄-, vorzugsweise C₁₂₋₂₀- oder C₁₄₋₂₀-Monocarbonsäure verestert sind. Der Gehalt an Carotinoidestern kann unter anderem chromatographisch ermittelt werden, da Carotinoidester bei geeigneten „reverse phase“-Trägermaterialien, wie z.B. langkettigen polymergebundenen C30-Phasen in der Regel längere Retentionszeiten aufweisen als ungebundene Carotinoide. Ein geeignetes C30 Trägermaterial und geeignete Trennbedingungen sind beispielhaft in Beispiel 3 genannt.

Eine enzymatische Einheit (U) Lipase bedeutet diejenige Menge an Enzym, die 1,0 Microäquivalente Fettsäure aus einem Triglycerid (z.B. Glycerintripalmitat) in einer Stunde bei 37°C und pH 7,7 freisetzt.

Eine enzymatische Einheit (U) Esterase bedeutet diejenige Menge an Enzym, welche innerhalb einer Minute 1,0 Micromol Ester-Substrat bei pH 7,0 und 37°C hydrolytisch vollständig spaltet. 1U Cholesterol Esterase bedeutet so z.B. diejenige Menge an Enzym, die unter den angegebenen Bedingungen 1 Micromol Cholesteryloleat in Gegenwart von Taurocholat zu Cholesterin und Oleinsäure innerhalb von einer Minute umsetzt.

„Organismen“ umfassen erfindungsgemäß pro- und eukaryotischen Mikroorganismen oder Pflanzen.

„Mikroorganismen“ sind dabei ausgewählt unter Bakterien, Hefen, Algen oder Pilzen.

Bevorzugte Mikroorganismen sind ausgewählt unter *Escherichia*, *Erwinia*, *Agrobacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Paracoccus*, *Nostoc*, Cyanobakterien der Gattung *Synechocystis*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Halobacterium*, *Phaffia*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Blakeslea*, *Phycomyces*, *Fusarium*, *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox*, *Chlamydomonas*, *Ankistrodesmus*, *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Coelastrum*, *Crucigenia*, *Dictyococcus*, *Hydrodictyon*, *Eremosphaera*, *Coelastrella*, *Botryococcus*, *Scenedesmus*, *Scotiellopsis*, *Protosiphon*, *Euglena*, *Nannochloropsis*, *Glenodinium*, *Aphanocapsa*, *Parmotrema*, *Cantharel-*

lus, Brevibacterium, Eremosphera, Pavlova, Gordonia, Isochrysis, Brydiazrhizobium, Myrmecia, Neochloris, Mycobacterium oder Dunaliella.

Erfindungsgemäß geeignete Pflanze sind ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Begoniaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Chenopodiaceae, 5 Cruciferae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Apocynaceae, Balsaminaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Graminae, Euphorbiaceae, Labiatae, Leguminosae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Lobeliaceae, Scrophulariaceae, Compositae, Asteraceae, Plumbaginaceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Rubiaceae, Poaceae, Polemoniaceae, Orchidaceae, Umbelliferae, Verbenaceae, Violaceae, Malvaceae, 10 Iliaceae oder Lamiaceae.

Insbesondere sind Pflanzengattungen wie Marigold, *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, 15 *Acacia*, *Aconitum*, *Adonis*, *Arnica*, *Aquilegia*, *Aster*, *Astragalus*, *Bignonia*, *Calendula*, *Caltha*, *Campanula*, *Canna*, *Centaurea*, *Cheiranthus*, *Chrysanthemum*, *Citrus*, *Crepis*, *Crocus*, *Curcubita*, *Cytisus*, *Delonia*, *Delphinium*, *Dianthus*, *Dimorphotheca*, *Doronicum*, *Eschscholtzia*, *Forsythia*, *Fremontia*, *Gazania*, *Gelsemium*, *Genista*, *Gentiana*, *Geranium*, *Gerbera*, *Geum*, *Grevillea*, *Helenium*, *Helianthus*, *Hepatica*, *Heracleum*, 20 *Hibiscus*, *Heliopsis*, *Hypericum*, *Hypochoeris*, *Impatiens*, *Iris*, *Jacaranda*, *Kerria*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Leontodon*, *Lilium*, *Linum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Lysimachia*, *Martia*, *Medicago*, *Mimulus*, *Narcissus*, *Oenothera*, *Osmanthus*, *Petunia*, *Photinia*, *Physalis*, *Phyteuma*, *Potentilla*, *Pyracantha*, *Ranunculus*, *Rhododendron*, *Rosa*, *Rudbeckia*, *Senecio*, *Silene*, *Silphium*, *Sinapsis*, *Sorbus*, *Spartium*, *Tecoma*, *Torenia*, *Tragopogon*, 25 *Trollius*, *Tropaeolum*, *Tulipa*, *Tussilago*, *Ulex*, *Viola* und *Zinnia* geeignet.

b) Beschreibung bevorzugter Ausführungsformen

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Hydrolyse von Carotinoidestern, wobei man einen Carotinoidester-haltigen Reaktanden, abgeleitet von einem natürlichen oder genetisch veränderten Organismus mit einem ester-spaltenden Enzym, ausgewählt unter Carboxylsäureester-spaltenden Hydrolasen (E.C. 3.1.1.), bis zur im wesentlichen quantitativen hydrolytischen Esterspaltung inkubiert und das (die) gebildete(n) Carotinoid(e) gegebenenfalls aus dem Reaktionsansatz isoliert. 35

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens liegt die Reaktionszeit im Bereich von mehr als 1 Stunde, wie z.B. 1 bis 48, 5 bis 45, 10 bis 40, 15 bis 35 oder 20 bis 30 Stunden. Die erforderliche Länge der Reaktion bis zur Erzielung der gewünschten im

wesentlichen quantitativen Hydrolyse kann vom Fachmann durch Probenahme und Analyse z.B. der verbrauchten Estermenge, in einfacher Weise bestimmt werden.

- Erfindungsgemäß bevorzugt eingesetzte Hydrolasen sind ausgewählt unter Lipasen (E.C. 3.1.1.3) und Esterasen (E.C. 3.1.1.13), sowie Gemischen davon. Bevorzugte Enzyme sind z.B. Lipasen aus *Candida* sp., wie z.B. Lipase Typ 7 aus *Candida rugosa* oder eine Cholesterin Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas spec.*, Rinderpankrea und Schweinepankreas. Weitere bevorzugte Lipasen sind bekannt aus *Candida antarctica*, *Candida cylindrica*, *Candida cylindracea*, *Candida lipolytica*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas spec.*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas alcaligenes*, Schweinepankreas, Schweineleber, *Humicola spec.*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor javanicus*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus japonicus*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopus delemar*, *Alcaligenes spec.*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium cyclopium*, *Carica papaya* L., *Mucor miehei*, *Aspergillus niger*, *Chromobacter viscosum*, *Thermomyces lanuginosa*. Die erfindungsgemäßen Enzyme können dabei in freier (z.B. gelöster) oder immobilisierter, trägergebundener Form vorliegen. Methoden zur Enzym-Immobilisierung sind dem Fachmann geläufig und z.B. in *Biotechnology*, Rehm et al Hrsg., Vol.3 VCH Verlagsgesellschaft, 2. Auflage, Kapitel 17 beschrieben.
- Insbesondere ist es bevorzugt, dem Reaktionsansatz das Enzym in einer solchen Gesamtmenge zugesetzt wird, dass die Gesamtaktivität an zugesetztem Enzym, jeweils bezogen auf den Gesamtcarotinoid-Gehalt (in µg bzw. mg) in folgendem Bereich liegt:
- Lipase: mehr als 10, insbesondere mehr als 20, oder mehr als 30, wie insbesondere 50 bis 5.000 oder 50 bis 4.000 oder 50 bis 3.000 oder 500 bis 3.000 U/µg Gesamtcarotinoide.
 - Esterase: mehr als 1, insbesondere mehr als 5, wie z.B. 10 bis 500 oder 50 bis 300 oder 100 bis 200 U/mg Gesamtcarotinoide.
- Die angegebenen Gesamtenzymaktivitäten entsprechen der bei Reaktionsbeginn vorgelegten Enzymaktivität, oder, falls die Zugabe in mehreren Portionen zu verschiedenen Zeiten der Reaktion erfolgen sollte, der rechnerischen Summe der anfänglichen Enzymaktivitäten der zugesetzten Einzelportionen.
- In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird der Carotinoidester-haltige Reaktand in einem wasserhaltigen Reaktionsmedium mit dem esterspaltenden Enzym inkubiert, wobei die Carotinoidester gegebenenfalls in emulgierter Form im Medium vorliegen und wobei dem Reaktionsmedium gegebenenfalls wenigstens ein Emulgator in einer Menge zugesetzt wird, so dass das Mengen-Verhältnis von Emulgator (z.B. in

mg) zu Carotinoid (z.B. in mg) im Bereich von etwa 100:1 bis 2000:1, wie etwa in Bereich von 500:1 bis 1000:1 liegt.

- 5 Vorzugsweise umfasst der Emulgator wenigstens eine Verbindung, ausgewählt unter Cholansäure und Derivaten davon sowie Gemischen dieser Verbindungen. Insbesondere ist der Emulgator eine (vorzugsweise in etwa äquimolare) Mischung von Cholsäure und Desoxycholsäure ist.

- 10 Zusätzlich oder anstelle des oben genannten Emulgatorsystems können im erfindungsgemäßen wässrigen Reaktanden andere die Löslichkeit hydrophober Carotinoider verbessernder Zusätze enthalten sein. Beispiele hierfür sind Detergentien, wie z.B. Digitonin, Octylglucosid, Brij 35 (Dodecylpoly(oxyethyleneglycolether)), Genapol X-080 (Isotridecyl(ethyleneglycolether)), Nonidet P-40 (Ethylphenolpoly(ethyleneglycolether)), Synperonic P/F 68 (Polyethyleneglycol-polypropyleneglycol-copolymer),
15 Synperonic P/F 127 (Polyethyleneglycol-polypropyleneglycol-copolymer), Thesit (Dodecylpoly(ethyleneglycolether)_n, Triton X-100 und Triton X-114 (Octylphenolpoly(ethyleneglycolether)_n, Tween 20 und Tween 80 (Poly(oxyethylene)_n-sorbitanemonooleate), Decanoyl-N-methylglucamid (MEGA 10; N-(D-Gluco-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)-N-methyldecanamide), Deoxy-BigCHAP (N,N-bis-(3-D-glucosamidopropyl)-deoxycholamide), n-Dodecylglucosid (1-O-n-Dodecyl-β-D-glucopyranoside), n-Dodecylmaltosid (1-O-n-Dodecyl-β-D-glucopyranosyl (1→4) α-D-glucopyranosid), HECAMEG (6-O-(N-heptyl-carbamoyl)-methyl-α-D-glucopyranosid), Octanoyl-N-Methylglucamid (MEGA 8; N-(D-Gluco-2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)-N-methyloctanamid), Sucrosemonolaurate, Taurocholsäure, Taurodeocycholsäure, Lithiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat, CHAPS (3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propan-sulfonat), CHAPSO (3-((3-Cholamidopropyl)dimethylammonio)-2-hydroxy-1-propan-sulfonat), N-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propan-sulfonat (Sulfobetain SB12), N-Tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propan-sulfonat (Sulfobetain SB14) oder Lösungsvermittlern.

- 30 Insbesondere kann das Reaktionsmedium ein wässrig-organisches Medium sein, welches ein organisches Lösungsmittel in einem Volumenanteil von etwa 5 bis 95 Vol.-%, wie z.B. 5 bis 50 oder 5 bis 30 oder 5 bis 15 Vol.-%, bezogen auf das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes, enthält. Das organischen Lösungsmittel ist dabei ausgewählt
35 unter niedrig-aliphatischen Ketonen (wie Aceton), C₄-C₁₀-Alkanen (wie n-Butan, n-Pentan, n-Hexan, n-Heptan, n-Octan und die ein- oder mehrfach verzweigten Analoga davon), C₁-C₁₀-Alkanolen (insbesondere Methanol, Ethanol, n- oder iso-Propanol, n- oder tert.-Butanol), Ethern (wie Di-C₂-C₆-alkylethern, wie z.B. Isopropylether, oder DMSO und DMF) und aromatischen Lösungsmitteln (wie Benzol, Xylol oder Toluol)

und Gemischen davon. Bei Verwendung von Aceton ist ein Volumenanteil des Acetons im Bereich von etwa 5 bis 15 Vol.-%, insbesondere etwa 10 Vol.-%, bevorzugt.

Insbesondere wird das erfindungsgemäße Verfahren so durchgeführt, dass der Reaktionsansatz einen pH-Wert im Bereich von etwa 6 bis 8, insbesondere 6,5 bis 7,5, aufweist. Zur Einstellung des pH-Wertes können übliche Puffer, wie Alkaliphosphat-, Tris-, PIPES- oder HEPES-Puffer, verwendet werden. Andere geeignete Puffer sind dem Fachmann geläufig. Auswahl von Art, Konzentration und Pufferbereich obliegen dem Fachmann und können dem jeweils verwendeten Reaktionsansatz durch wenige Vorversuche optimal angepasst werden

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Carotinoidester-haltigen Reaktanden in einem im Wesentlichen nichtwässrigen Reaktionsmedium mit dem esterspaltenden Enzym inkubiert. Das nichtwässrige Reaktionsmedium enthält dabei wenigstens ein organisches Lösungsmittel, ausgewählt unter C₄-C₁₀-Alkanen, C₁-C₁₀-Alkanolen, Di-C₂-C₆-alkylethern und aromatischen Lösungsmitteln, insbesondere solche gemäß obiger Definition.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich besonders zur Hydrolyse eines Reaktanden, der wenigstens einen Carotinoid-Monoester oder -Diester einer C₁₀₋₂₄-, vorzugsweise C₁₄₋₂₀-Monocarbonsäure gemäß obiger Definition umfasst.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der Reaktand abgeleitet aus natürlichen oder rekombinanten, pro- oder eukaryotischen Mikroorganismen oder Pflanzen oder Teilen davon. Der Reaktand wird vorzugsweise durch Extraktion mit Hilfe eines organischen Lösungsmittels (insbesondere gemäß obiger Definition) oder Gemischen von solchen organischen Lösungsmitteln gewonnen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Reaktion mehrstufig unter wiederholter Zugabe von Enzym erfolgt. Gewöhnlich ist es ausreichend für eine im Wesentlichen quantitative Esterspaltung, wenn dem Reaktionsmedium in einer zweiten Stufe eine weitere Enzymportion zugesetzt wird. Zeitpunkt und Menge kann der Fachmann in einfacher Weise bestimmen. Stellt er z.B. durch Probennahme fest, dass keine weitere Esterhydrolyse erfolgt, obwohl noch nicht umgesetzter Ester im Medium enthalten ist, so kann er eine ausreichende Menge Enzym nachdosieren. Erforderlichenfalls kann diese Nachdosierung wiederholt werden.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das Enzym in trägergebundener Form eingesetzt. Beispiele geeigneter Träger sind z.B. beschrieben in Biotechnology, Vol. 3, a.a.O.)

- 5 Die Reaktionstemperatur liegt erfindungsgemäß vorzugsweise im Bereich von etwa 20 bis 70 °C, je nach Temperaturoptimum des eingesetzten Biokatalysators. Beispielsweise kann die Reaktionstemperatur im Bereich von 25 bis 45 oder 30 bis 40 °C liegen.

- 10 In einer weiteren Variante umfasst der Carotinoidester-haltige Reaktand wenigstens einen von Ketocarotinoidestern verschiedenen Carotinoidester, wenigstens einen Ketocarotinoidester oder Gemische von solchen Carotinoidestern und Ketocarotinoidestern.

Insbesondere ist der Ketocarotinoidester abgeleitet von Astaxanthin.

- 15 Vorzugsweise werden die gespaltenen Carotinoide und/oder Ketocarotinoide in an sich bekannter Weise aus dem Reaktionsmedium isoliert.

- 20 Das erfindungsgemäße Verfahren kann batchweise, semi-batchweise oder kontinuierlich betrieben werden. Die Durchführung des Verfahrens kann vorteilhafterweise auch in Bioreaktoren erfolgen, wie z.B. beschrieben in Biotechnology, Vol. 3, (a.a.O.)

- 25 Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft schließlich die Verwendung der in obiger Weise hergestellten Carotinoide zur Herstellung von Nahrungs- und Futtermittelzusätzen.

c) Herstellung transgener Ketocarotinoidester-produzierender Tagetes-Pflanzen

- 30 Es wird eine rekombinante, Ketolase-Aktivität exprimierende Tagetes Pflanze hergestellt. Mit Hilfe dieser Ketolase wird es ermöglicht, in den β -Iononring von Carotinoiden eine Ketogruppe einzuführen. Geeignete Ketolase-kodierende Sequenzen sind aus dem Stand der Technik bekannt, wie z.B. von Haematococcus pluvialis Accession No.: D45881). Andere geeignete Gene und die Herstellung geeigneter Konstrukte sind in der DE 10258971 beschrieben, worauf hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird.

- 35 Die Herstellung transgener Pflanzen kann z.B. in folgender Weise erfolgen: Tagetessamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, Physiol. Plant. 15(1962), 473-497; pH 5,8, 2 % Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C/20-200 μ E/3

bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70 µE, für 4 bis 8 Wochen.

Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten in vitro Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm² werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

Ein beliebiger Agrobakterium tumefaciens Stamm, bevorzugt aber ein supervirulenter Stamm, wie z.B. EHA105 mit einem entsprechenden Binärplasmid (hergestellt in an sich bekannter Weise), das ein Selektionsmarkergen (bevorzugt *bar* oder *pat*) sowie ein Ketolase-Gen trägt, wird über Nacht angezogen und für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet. Die Anzucht des Bakterienstammes kann wie folgt erfolgen: Eine Einzelkolonie des entsprechenden Stammes wird in YEB (0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Rindfleischextrakt, 0,5 % Pepton, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Magnesiumsulfat x 7 H₂O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 Stunden angezogen. Anschließend wird die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, dass sich eine OD₆₀₀ von ca. 0,1 bis 0,8 einstellt. Diese Suspension wird für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der Agrobakteriensuspension erfolgt für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8 % Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80 µMol/m² x sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren übertragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

- Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberellinsäure GA_3 , zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- 10 - Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- 15 - Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- 20 - Die Zugabe von $AgNO_3$ (3 - 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Citronensäure, Ascorbinsäure, PVP, wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- 25 - Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.
- 30 Aus den auf diese Weise transformierten Pflanzen werden solche mit erhöhter Ketolase-Aktivität selektiert, vermehrt und als Ausgangsmaterial für die erfindungsgemäße Carotinoidester-Hydrolyse eingesetzt.

35 d) Extraktionsmethoden für Carotinoidester

- Carotinoide und deren Ester, wie Astaxanthin und dessen Mono- und Diester, können aus den Carotinoid-haltigen Mikroorganismen, Pflanzen oder Pflanzenteilen, die gegebenenfalls vorher getrocknet und/oder zerkleinert wurden, durch organische Lösungsmittel extrahiert werden, wie beispielsweise durch Aceton, Hexan, Methylenchlorid,

tert.-Butylmethylether oder durch Lösungsmittelgemische wie Ethanol/Hexan oder Aceton/Hexan. Durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse der Lösungsmittel kann aufgrund der verschiedenen Polarität die Extraktionswirkung variiert werden. Durch eine solche Extraktion lassen sich Carotinoide und deren Ester in hoher Konzentration anreichern.

Anschließend kann durch Ausschütteln der Carotinoide und deren Ester und chromatografische Auftrennung des Gemisches deren Reinheit weiter erhöht werden.

10 Auf diese Weise hergestellte Extrakte eignen sich besonders als Reaktand zur Durchführung der erfindungsgemäßen Reaktion.

e) Allgemeine Durchführung der Lipase-katalysierten Esterhydrolyse

15 Zerkleinertes Ausgangsmaterial, z.B. gemörstertes Petalenmaterial, wird mit einem organischen Lösungsmittel, z.B. 100% Aceton, gegebenenfalls mehrmals über einen geeigneten Zeitraum unter Schütteln (z.B. dreimal, jeweils etwa 15 Minuten) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in einem geeigneten Volumen organischem Lösungsmittels, z.B. Aceton aufgenommen, mit geeignetem Puffer, z.B. Kaliumphosphat-Puffer (100 mM, pH7.4), verdünnt, z. B. im Verhältnis 10:1 (Puffer zu Lösungsmittel) und gut gemischt. Danach erfolgt gegebenenfalls die Zugabe eines geeigneten Emulgators oder Dispergators, wie z.B. Bile-Salzen, (z.B. in Mengen von 1 mg pro µg Carotinoid). Weiterhin ist die Zugabe von stabilisierenden Salzen, wie z.B. einer NaCl/CaCl₂-Lösung, von Vorteil. Die Suspension wird anschließend ausreichend, z.B. für 30 Minuten bei 37°C, inkubiert. Für die enzymatische Hydrolyse der Carotinoidester wird dann eine Lipaselösung (z.B. Lipase Typ7 von *Candida rugosa* (Sigma)) zugegeben und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach einer ersten Inkubationsphase, wie z.B. etwa 21 Stunden, erfolgt nochmals eine Zugabe von Lipase mit erneuter Inkubation bei 37°C, z.B. über einen Zeitraum von mindestens etwa 5 Stunden, bis zur im Wesentlichen quantitativen Hydrolyse der Ester. Die eingesetzte Gesamtmenge an Lipase beträgt z.B. etwa 500 bis 3000 U/µg Carotinoid. Anschließend werden die Carotinoide durch kräftiges Mischen (nach Zugabe von Na₂SO₄ (wasserfrei)) in ein organisches, mit Wasser im Wesentlichen nicht mischbares Lösungsmittel, wie z.B. Petrolether, extrahiert. Dieses Ausschütteln wird solange wiederholt, bis die organische Phase farblos bleibt. Die organischen Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel wird evaporiert. Freie Carotinoide werden anschließend analysiert.

f) Allgemeine Durchführung einer Esterase-katalysierten Esterhydrolyse

Zerkleinertes Ausgangsmaterial, z.B. gemörstertes Petalenmaterial, wird mit einem organischen Lösungsmittel, z.B. 100% Aceton, gegebenenfalls mehrmals über einen geeigneten Zeitraum unter Schütteln (z.B. dreimal, jeweils etwa 15 Minuten) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in einem geeigneten Volumen eines organischen Lösungsmittels, wie z.B. Aceton, aufgenommen (Absorption bei 475 nm z.B. zwischen 0,75 und 1,25) und suspendiert, z.B. durch 5-minütige Behandlung im Ultraschall-Bad. Der Carotinoid-Extrakt wird mit in einem geeigneten Puffer (z.B. Tris-HCl-Puffer, 50 mM; pH 7,0) gemischt und inkubiert (z.B. 5-10 Minuten bei 37°C). Danach erfolgt die Zugabe von Esterase (z.B. einer Cholesterol-Esterase von *Pseudomonas spec.* oder einer Cholesterol-Esterase von *Pseudomonas fluorescens*). Nach einer ersten Inkubationsphase (z.B. nach 8-12 Stunden) wird nochmals Enzym zugegeben; die im Wesentlichen quantitative Hydrolyse der Ester erfolgt innerhalb von etwa 24 Stunden bei Inkubation bei 37°C. Die eingesetzte Gesamtmenge an Esterase beträgt z.B. etwa 10 bis 500 U/mg Carotinoid. Nach Zugabe von Salz z.B. Na₂SO₄ (wasserfrei) wird mit einem mit Wasser im Wesentlichen nicht mischbaren organischen Lösungsmittel, wie Petrolether, gut gemischt und zentrifugiert (z.B. 3 Minuten; 4500g). Dieser Vorgang wird gegebenenfalls mehrmals wiederholt. Die organischen Phasen werden vereinigt und evaporiert. Die gebildeten Carotinoide werden anschließend analysiert.

20

g) Esterhydrolyse in organischen Lösungsmittel anstelle eines wässrigen Milieus

Esterhydrolysen in organischem Lösungsmittel können von Vorteil sein, da

- 25 - organische Lösungsmittel das thermodynamische Equilibrium verschieben können,
- einige Lipasen ihr katalytisches Zentrum nur in Gegenwart einer Lipidphase oder vermutlich in organischem Lösungsmittel exponieren,
- die Verwendung von Bile-Salzen im wässrigen Milieu kostenintensiv ist,
- 30 - Lipasen in organischen Lösungsmitteln über lange Zeiträume (Wochen bis Monate) auch bei erhöhten Temperaturen von z.B. 60°C aktiv bleiben.

Es kann die erfindungsgemäße Esterhydrolyse z.B. mit einer immobilisierten Lipase B von *Candida antarctica*, NOVO 435 von Novo Nordisk, in 100% n-Heptan zur Hydrolyse von Carotinoidestern sogar bei erhöhten Temperaturen bis 60°C eingesetzt werden.

35

Es werden im Wesentlichen quantitative Hydrolyseraten beobachtet.

Als weitere brauchbare organische Reaktionsmedien sind n-Butanol, Hexan, Isooctan, Toluol, Butylether und Isopropylether denkbar.

40

M/44120-PCT

h) Aufarbeitung der Reaktionsprodukte

Das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Produkt, wie z.B. Astaxanthin, lässt sich vorteilhaft aus der wässrigen Reaktionslösung über Extraktion gewinnen. Die Extraktion kann zur Erhöhung der Ausbeute mehrfach wiederholt werden. Beispiele für geeignete Extraktionsmittel sind Lösungsmittel, wie Toluol, Methylenchlorid, Butylacetyl, Diisopropylether, Benzol, MTBE, Petrolether oder Essigester, ohne darauf beschränkt zu sein.

10

Wird die Reaktion im organischen Medium durchgeführt, so ist in einem ersten Schritt die Abtrennung des Enzyms von der organischen Phase ausreichend.

15

Nach Einengen der so erhaltenen organischen Phase können die Produkte in der Regel in guten chemischen Reinheiten gewonnen werden.

20

Nach der Extraktion kann die organische Phase mit dem Produkt aber auch nur zum Teil eingengt und das Produkt auskristallisiert werden. Dazu wird die Lösung vorteilhaft auf eine Temperatur von 0 °C bis 10 °C abgekühlt. Die Kristallisation kann auch direkt aus der organischen Lösung erfolgen. Das auskristallisierte Produkt kann nochmals im gleichen oder in einem anderen Lösungsmittel zur erneuten Kristallisation aufgenommen werden und nochmals kristallisiert werden.

25

Es ist aber auch möglich das erfindungsgemäß hergestellte Produkt weiter aufzureinigen. Hierzu wird das produktthaltige Medium, gegebenenfalls nach dem Abtrennen des Enzyms, einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Produkt oder die Verunreinigungen ganz oder teilweise auf dem Chromatographieharz zurückgehalten werden. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere Chromatographiehharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographiehharze und ihrer wirksamsten Anwendung bewandert.

30

Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindung(en) kann durch bekannte Techniken bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese Analyseverfahren sind zusammengefasst in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal,

40

G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

5 i) Anwendungen der erfindungsgemäß hergestellten Produkte:

Die erfindungsgemäßen Hydrolyseprodukte eignen sich insbesondere als Nahrungs- und Futtermittelzusatz. Sie fördern vor allem die Pigmentierung nach, vorzugsweise oraler, Verabreichung.

10

Unter „Pigmentierung“ wird erfindungsgemäß vorzugsweise die Intensivierung oder Verursachung einer Farbe zumindest eines Teils eines Tieres oder Tierproduktes des pigmentierten Tieres im Vergleich zum nicht pigmentierten Tier verstanden. So bewirken insbesondere Astaxanthin-haltige Pigmentierstoffe die Erzeugung oder Intensivierung eines rosa bis rosa-roten Farbtons.

15

Bevorzugte Tiere, die durch die erfindungsgemäße orale Verabreichung pigmentiert werden können, sind Tiere, ausgewählt unter Fischen, Crustaceen oder Vögeln, insbesondere Galliformes und Anatridae. Bevorzugte Fische sind Salmoniden, insbesondere Lachs oder Forelle. Bevorzugte Crustaceae sind Shrimps oder Krebse. Bevorzugte Galliformes sind Hühner, Enten oder Gänse. Bevorzugter Anatridae ist Flamingo.

20

Je nach pigmentiertem Tier werden vorzugsweise unter pigmentierten Tierprodukten insbesondere Fleisch für Lachs oder Forelle, Haut für Hühner, Enten oder Gänse, Feder für Hühner, Enten, Gänse oder Flamingo und Ei bzw. Eidotter für Hühner, Enten oder Gänse verstanden.

25

Die orale Verabreichung der Carotinoide an Tiere kann direkt erfolgen oder, vorzugsweise, über orale Verabreichung von Tierfutterzubereitungen, denen zuvor das Carotinoid beigemischt wurden. Die Carotinoide können dabei in fester oder flüssiger Form vorliegen.

30

Die Carotinoide können, soweit die noch enthaltenen Lösungsmittel für die entsprechenden Tiere physiologisch unbedenklich sind, direkt der Tierfutterzubereitung oder nach Abdampfen der noch enthaltenen Lösungsmittel in Form Carotinoid-haltiger Pulver oder Öle eingesetzt werden. Eine vorherige Aufreinigung des erhaltenen Hydrolyseproduktes ist nicht zwingend erforderlich.

35

Die erhaltenen Carotinoid-haltigen Pulver oder Öle können beispielsweise in Fischöl eingearbeitet werden, auf pulverige Trägermaterialien, wie beispielsweise Weizenmehl,

40

aufgebracht werden, oder in Alginaten, Gelatine oder Lipide eingeschlossen werden.

Der Erfindung betrifft daher auch Tierfutterzubereitungen, enthaltend neben üblichen Tierfutterbestandteilen wenigstens ein erfindungsgemäßes Carotinoid-Hydrolysat.

5

So kann beispielsweise eine Fischfutterzubereitung weitere übliche Fischfutterkomponenten enthalten, wie z.B. Fischmehl und/oder andere Proteine, Öle, wie beispielsweise Fischöle, Getreide, Vitamine, Mineralien, Konservierungsstoffe und gegebenenfalls Medikamente in üblichen Mengen.

10

Eine typische Fischfutterrezeptur für Forellen setzt sich beispielsweise aus folgenden Komponenten zusammen:

		Einwaage f. 500 kg
Komponenten	Gew.-%	kg
Fischmehl	30,00	150,00
Sojavollfettbohnen	20,00	100,00
Weizenquellstärke	18,00	90,00
Vitamin-Prämix	0,80	4,00
Cholinchlorid (50%)	0,20	1,00
Weizenkleber	20,00	100,00
Sipernat 50S	3,00	15,00
Fischöl	8,00	40,00

15

Eine typische Fischfutterrezeptur für Lachse setzt sich beispielsweise aus folgenden Komponenten zusammen:

Komponenten	Gew.-%
Fischmehl	75,00
Pflanzliches Protein	5,00
Getreide	7,80

Vitamine/Mineralien	1,00
Antioxidantien/Konservierungsstoffe	0,20
Fischöl	11,00

Den Tierfutterzubereitungen können die erfindungsgemäßen Hydrolysate in Pulverform oder flüssig, wie z.B. als Öl beigemischt werden. Die so erhaltenen Tierfutterzubereitungen können in an sich bekannter Weise pelletiert oder besonders vorteilhaft extrudiert werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Carotinoid-haltigen Präparate den Tierfutterzubereitungen vorzugsweise in flüssiger Form beigemischt. Dies ist insbesondere vorteilhaft bei der Herstellung von extrudierten Futterzubereitungen. Der Extrusionsprozess führt zu Extrusionsstress auf die empfindliche Stoffe, wie beispielsweise Astaxanthin, der zu einem Astaxanthinverlust führen kann. Bei Extrusionsstress handelt es sich primär um die Einwirkung mechanische Kräfte (Kneten, Scherung, Druck, etc.) jedoch auch um hydrothermischen Stress, verursacht durch Wasser- und Wasserdampfzugaben, auch oxidativer Stress ist zu beobachten.

Um die durch den oben beschriebenen Extrusionsprozess auftretende Stoffverluste zu vermeiden, können flüssige Carotinoid-haltige Extrakte durch die sogenannte PPA-Technik nach dem Extrusions - und Trocknungsprozess unter Vakuum appliziert werden (*post pelleting application*).

Die Carotinoid-haltigen Hydrolysate können, soweit die noch enthaltenen Lösungsmittel für die entsprechenden Tiere physiologisch unbedenklich sind, auch direkt oral an Tiere verabreicht werden.

Die Carotinoid-haltigen Hydrolysate können aber auch erst nach Abdampfen der noch enthaltenen Lösungsmittel in Form von Pulver oder Ölen verabreicht werden.

Die erhaltenen Carotinoid-haltigen Pulver oder Öle können beispielsweise in Fischöl eingearbeitet werden, auf pulverige Trägermaterialien, wie beispielsweise Weizenmehl, aufgebracht werden, oder in Alginate, Gelatine oder Lipide eingeschlossen werden.

Der Erfindung betrifft daher auch Pigmentiermittel, enthaltend Carotinoid-haltigen Hydrolysate, wobei diese gegebenenfalls wie vorstehend beschrieben prozessiert sein können.

Experimenteller TeilBeispiel 1: Enzymatische Cholesterol-Esterase-katalysierte Hydrolyse von Carotinoidestern aus Pflanzenmaterial und Identifizierung der Carotinoide

5

Allgemeine Arbeitsvorschrift

- Gemörsertes Pflanzenmaterial (z.B. Petalenmaterial) (50 bis 100 mg Frischgewicht) wird mit 100 % Aceton (dreimal 500 µl; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert.
- 10 Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in 400 µl Aceton aufgenommen (Absorption bei 475 nm zwischen 0.75 und 1,25) und 5 min im Ultraschall-Bad behandelt. Der Carotinoid-Extrakt wird mit 300 µl 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,0) gemischt und 5 bis 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe von 100 bis 200 µl Cholesterol-Esterase (Stammlösung: 6,8 U/ml einer Cholesterol-
- 15 Esterase von *Pseudomonas spec.*). Nach 8 bis 12 Stunden wird nochmals 100 bis 200 µl Enzym zugegeben; Hydrolyse der Ester erfolgt innerhalb von 24 Stunden bei Inkubation bei 37°C. Nach Zugabe 0.35 g $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ und 500 µl Petrolether wird gut gemischt und zentrifugiert (3 Minuten; 4500 g). Petrolether-Phase wird abgezogen und nochmals mit 0,35 g Na_2SO_4 (anhydrous) gemischt. Zentrifugation für 1 Minute bei
- 20 10000 g. Petrolether wird evaporiert und freie Carotinoide werden in 100 bis 120 ml Aceton aufgenommen. Mittels HPLC und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-VIS-Spektren identifiziert werden.

25 Beispiel 2: Enzymatische Lipase-katalysierte Hydrolyse von Carotinoidestern aus Pflanzenmaterial und Identifizierung der Carotinoide

Allgemeine Arbeitsvorschrift

- 30 a) Gemörsertes Pflanzenmaterial (z.B. Petalenmaterial) (30-100 mg Frischgewicht) wird mit 100% Aceton (dreimal 500µl; jeweils etwa 15 Minuten schütteln) extrahiert. Das Lösungsmittel wird evaporiert. Carotinoide werden anschließend in 495 µl Aceton aufgenommen, 4,95 ml Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH7.4) zugegeben und gut gemischt. Danach erfolgt die Zugabe von ca. 17 mg Bile-Salze (Sigma) und 149 µl ei-
- 35 ner $\text{NaCl}/\text{CaCl}_2$ -Lösung (3M NaCl und 75 mM CaCl_2). Die Suspension wird für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Für die enzymatische Hydrolyse der Carotinoidester wird 595 µl einer Lipaselösung (50 mg/ml Lipase Typ7 von *Candida rugosa* (Sigma)) zugegeben und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach etwa 21 Stunden erfolgte nochmals eine Zugabe von 595 µl Lipase mit erneuter Inkubation von mindestens 5 Stunden bei 37°C.
- 40 Anschließend werden etwa ca. 700 mg Na_2SO_4 in der Lösung gelöst. Nach Zugabe

- von 1800 µl Petrolether werden die Carotinoide durch kräftig Mischen in die organische Phase extrahiert. Dieses Ausschütteln wird solange wiederholt, bis die organische Phase farblos bleibt. Die Petroletherfraktionen werden vereinigt und der Petrolether evaporiert. Freie Carotinoide werden in 100-120 µl Aceton aufgenommen. Mittels
- 5 HPLC und C30-reverse phase-Säule können freie Carotinoide aufgrund von Retentionszeit und UV-VIS-Spektren identifiziert werden.

Die verwendeten Bile-Salze oder Gallensäuresalze sind 1:1 Mischungen von Cholat und Desoxycholat.

10

b) Arbeitsvorschrift für Aufarbeitung, wenn nur geringe Mengen an Carotinoidestern im Pflanzenmaterial vorhanden sind

- Alternativ kann die Hydrolyse der Carotinoidester durch Lipase aus *Candida rugosa* nach Trennung mittels Dünnschichtchromatographie erreicht werden. Dazu werden 50-100mg Pflanzenmaterial dreimal mit etwa 750µl Aceton extrahiert. Der Lösungsmittel-extrakt wird im Vakuum einrotiert (erhöhte Temperaturen von 40-50°C sind tolerabel). Danach erfolgt Zugabe von 300µl Petrolether:Aceton (Verhältnis 5:1) und gute Durchmischung. Schwebstoffe werden durch Zentrifugation (1-2 Minuten) sedimentiert.
- 15 Die obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das verbleibende Rest wird erneut mit 200µl Petrolether:Aceton (Verhältnis 5:1) extrahiert und Schwebstoffe werden durch Zentrifugation entfernt. Die beiden Extrakte werden zusammengeführt (Volumen 500µl) und die Lösungsmittel evaporiert. Der Rückstand wird in 30µl Petrolether:Aceton (Verhältnis 5:1) resuspendiert und auf eine Dünnschichtplatte (Silica-Gel 60, Merck) aufgetragen. Falls mehr als eine Auftragung für präparativ-analytische Zwecke erforderlich ist, sollten mehrere Aliquots mit jeweils 50-100 mg Frischgewicht in der beschriebenen Weise für die dünnschichtchromatographische Trennung aufbereitet werden.
- 20
- 25

- 30 Die Dünnschichtplatte wird in Petrolether:Aceton (Verhältnis 5:1) entwickelt. Carotinoidbanden können visuell aufgrund ihrer Farbe identifiziert werden. Einzelne Carotinoidbanden werden ausgekratzt und können für präparativ-analytische Zwecke gepoolt werden. Mit Aceton werden die Carotinoide vom Silica-Material eluiert; das Lösungsmittel wird im Vakuum evaporiert. Zur Hydrolyse der Carotinoidester wird der Rückstand in 495µl Aceton gelöst, 17mg Bile-Salze (Sigma), 4,95ml 0.1M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) und 149µl (3M NaCl, 75mM CaCl₂) zugegeben. Nach guter Durchmischung wird 30min bei 37°C äquilibriert. Danach erfolgt die Zugabe von 595µl Lipase von *Candida rugosa* (Sigma, Stammlösung von 50mg/ml in 5mM CaCl₂). Über Nacht erfolgt die Inkubation mit Lipase unter Schütteln bei 37°C. Nach etwa 21 Stunden wird
- 35
- 40 nochmals die gleiche Menge an Lipase zugegeben; für mindestens 5 Stunden wird

nochmals bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dann erfolgt die Zugabe von 700mg Na₂SO₄ (wasserfrei); mit 1800µl Petrolether wird für ca. 1 Minute ausgeschüttelt und die Mischung bei 3500 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Ausschütteln so lange wiederholt, bis die obere Phase farblos ist. Die vereinigte Petrolether-Phase wird im Vakuum eingeeengt (Temperaturen von 40-50°C sind möglich). Der Rückstand wird in 120µl Aceton, eventuell mittels Ultraschall, gelöst. Die gelösten Carotinoide können mittels HPLC unter Verwendung einer C30-Säule getrennt und anhand von Referenzsubstanzen quantifiziert werden.

10

Obige Angaben in den Beispielen 1 und 2 sind entsprechend auf Algenmaterial übertragbar.

Beispiel 3: HPLC-Analyse freier Carotinoide

15

Die Analyse der nach der Arbeitsvorschrift von Beispiel 1 und 2 erhaltenen Proben erfolgt unter folgenden Bedingungen:

Folgende HPLC-Bedingungen wurden eingestellt.

- 20 Trennsäule: Prontosil C30-Säule, 250 x 4,6 mm, (Bischoff, Leonberg, Germany)
 Flussrate: 1.0 ml/min
 Eluenten: Laufmittel A - 100% Methanol
 Laufmittel B - 80% Methanol, 0.2% Ammoniumacetat
 Laufmittel C - 100% t-Butyl-methylether
 25 Detektion: 300-530 nm

Gradientenprofil:

Zeit	Flussrate	% Laufmittel A	% Laufmittel B	% Laufmittel C
1.00	1.0	95.0	5.0	0
12.00	1.0	95.0	5.0	0
12.10	1.0	80.0	5.0	15.0
22.00	1.0	76.0	5.0	19.0
22.10	1.0	66.5	5.0	28.5
38.00	1.0	15.0	5.0	80.0
45.00	1.0	95.0	5.0	0
46.0	1.0	95.0	5.0	0

Einige typische Retentionszeiten für erfindungsgemäß gebildete Carotinoide sind z.B.:

30

Violaxanthin 11, 7 min, Astaxanthin 17,7 min, Adonixanthin 19 min, Adonirubin 19,9 min, Zeaxanthin 21 min.

Einige typische Retentionszeiten-Bereiche für erfindungsgemäß gebildete Carotinoidester sind:

- Bei *Haematococcus* sind die Carotinoide am häufigsten mit Palmitat, Oleat, Linolat und Linolenat verestert. Typische Retentionszeiten liegen bei 28 bis 40 Minuten.
- Bei *Tagetes* sind die häufigsten Carotinoidester Dipalmitate, Myristat-Palmitate, Palmitat-Stearate und Dimyristate vertreten; die Monoester sind deutlich seltener. Typische Retentionszeiten liegen bei 28 bis 38 Minuten.
- Die Carotinoidester in Paprika tragen Fettsäuren der Längen C_{12} bis C_{16} wie z.B. Laurinsäure, Myristinsäure und Palmitinsäure. Am häufigsten kommen in rotem Paprika Carotinoide verestert mit Linolsäure, Palmitinsäure und Linolensäure vor. Typische Retentionszeiten liegen bei 28 bis 40 Minuten.
- Bei *Adonis* sind die Carotinoide am häufigsten mit Oleat, Palmitat, Myristat, Linoleat und Laureat verestert. Typischen Retentionszeiten liegen bei 28 bis 38 Minuten.

Beispiel 4: Lipase-katalysierte Esterhydrolyse mit verschiedenen Carotinoidester-Quellen

- Unter Befolgung der allgemeinen Lehre von Beispiel 2a werden Carotinoidester-Extrakte aus folgenden pflanzlichen Quellen bzw. Algen hergestellt und hydrolysiert:

- Paprika (*Capsicum annuum* L.)
Adonis (*Adonis aestivalis*)
Tagetes (*Tagetes erecta*)
BioAstin (*Haematococcus pluvialis*)

Außerdem wurde der Emulgatorgehalt (Gehalt an Bile Salzen) bei verschiedenen Experimenten variiert.

- Die ermittelten Hydrolyseraten sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

Hydrolyseraten für verschiedene Esterquellen

Quelle	Lipase [U/ μ g Carotinoid]	Emulgator [mg/mg Caroti- noid]	Hydrolyserate [%]	Abnahme der Hydrolyserate um [%]
Paprika	2400	900 450 = [50%]	89	- 5
Tagetes	2700	800 560 = [70%] 400 = [50%] 200 = [25%] ohne	95	- 7,4 15 10 11,5
Adonis	700	ohne	96 bis 99	-
BioAstin	2200	800	95	-

Spezifische Aktivität der eingesetzten Lipase aus *Candida rugosa*: 819 U/mg Protein.

5

Die Hydrolyseraten sind bezogen auf die Gesamtmenge an Ester. Dies sind bei Adonis und *Haematococcus* fast ausschließlich Ketocarotinoidester, bei Tagetes und Paprika ausschließlich Carotinoidester.

10

Patentansprüche

1. Verfahren zur enzymatischen Hydrolyse von Carotinoidestern, wobei man einen Carotinoidester-haltigen Reaktanden, abgeleitet von einem natürlichen oder
5 genetisch verändertem Organismus mit einem esterspaltenden Enzym, ausgewählt unter Carboxylsäureester-spaltenden Hydrolasen (E.C. 3.1.1.), bis zur im wesentlichen quantitativen hydrolytischen Esterspaltung inkubiert und das (die) gebildete(n) Carotinoid(e) gegebenenfalls aus dem Reaktionsansatz isoliert.
- 10 2. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Reaktionszeit im Bereich von 1 bis 48 Stunden liegt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Hydrolase ausgewählt ist unter Lipasen (E.C. 3.1.1.3) und Esterasen (E.C. 3.1.1.13), sowie Gemischen davon.
- 15 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei dem Reaktionsansatz Enzym in einer Gesamtmenge zugesetzt wird, so dass die Gesamtkonzentration an zugesetztem Enzym bezogen auf den Gesamtcarotinoid-Gehalt in folgendem Bereich liegt:
20 a) Lipase: 50 bis 3.000 U/ μ g
 b) Esterase: 10 bis 500 U/mg
- 25 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man einen Carotinoidester-haltigen Reaktanden in einem wasserhaltigen Reaktionsmedium mit dem esterspaltenden Enzym inkubiert, wobei die Carotinoidester gegebenenfalls in emulgierter Form im Medium vorliegen und wobei dem Reaktionsmedium gegebenenfalls wenigstens ein Emulgator in einer Menge zugesetzt wird, so dass das Mengenverhältnis von Emulgator zu Gesamtcarotinoid im Bereich von
30 500:1 bis 1000:1 liegt.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Emulgator wenigstens eine Verbindung, ausgewählt unter Cholsäure und Derivaten davon sowie Gemischen dieser Verbindungen umfasst.
- 35 7. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Emulgator eine Mischung von Cholsäure und Desoxycholsäure ist.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Reaktionsansatz einen pH-Wert im Bereich von etwa 6 bis 8 aufweist.
- 5 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Reaktionsmedium ein wässrig-organisches Medium ist, welches ein organisches Lösungsmittel in einem Volumenanteil von etwa 5 bis 95 Vol.-%, bezogen auf das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes, enthält.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das organischen Lösungsmittel ausgewählt ist unter Aceton, C₄-C₁₀-Alkanen, C₄-C₁₀-Alkanolen, Di-C₂-C₆-Alkylethern und aromatischen Lösungsmitteln und Gemischen davon.
- 15 11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei man den Carotinoidesterhaltigen Reaktanden in einem im Wesentlichen nichtwässrigen Reaktionsmedium mit dem esterspaltenden Enzym inkubiert.
- 20 12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das nichtwässrige Reaktionsmedium wenigstens ein organisches Lösungsmittel, ausgewählt unter C₄-C₁₀-Alkanen, C₄-C₁₀-Alkanolen, Di-C₂-C₆-Alkylethern und aromatischen Lösungsmittel enthält.
- 25 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Enzym eine Lipase aus *Candida* sp. oder eine Cholesterin Esterase aus *Pseudomonas* oder eine Mischung davon ist.
- 30 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Reaktand wenigstens eine Carotinoid-Monoester oder -Diester einer C₁₀₋₂₄-, vorzugsweise C₁₂₋₂₀-Monocarbonsäure umfasst.
- 35 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Reaktand abgeleitet ist aus natürlichen oder rekombinanten, pro- oder eukaryotischen Mikroorganismen oder Pflanzen oder Teilen davon.
16. Verfahren nach Anspruch 15 wobei der Reaktand durch Extraktion mit Hilfe eines organischen Lösungsmittels oder Gemischen von organischen Lösungsmitteln gewonnen wird.
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Reaktion mehrstufig unter wiederholter Zugabe von Enzym erfolgt.

18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Enzym in
trägergebundener Form eingesetzt wird.
- 5 19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Reaktions-
temperatur im Bereich von etwa 20 bis 70 °C liegt.
- 10 20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Carotinoi-
dester-haltige Reaktand wenigstens einen Carotinoidester, wenigstens einen
Ketocarotinoidester oder Gemische von Carotinoidestern und Ketocarotinoi-
destern umfasst.
- 15 21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei man die gespal-
tenen Carotinoide und/oder Ketocarotinoide aus dem Reaktionsmedium isoliert.
22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Ketocaroti-
noidester abgeleitet ist von Astaxanthin.
- 20 23. Verwendung der nach einem der vorhergehenden Ansprüche hergestellten Ca-
rotinoide zur Herstellung von Nahrungs- und Futtermittelzusätzen.

20

25